

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.00381

## 甜菜单体附加系 M14 种子形成方式

马 兰<sup>1,2,\*\*</sup> 杜洪岩<sup>1,\*\*</sup> 李荣田<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 黑龙江大学 / 分子生物学省高校重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150080; <sup>2</sup> 黑龙江省农业科学院大庆分院, 黑龙江大庆 163000

**摘 要:** 以具有显性标记性状的红叶柄栽培甜菜为父本与绿叶柄 M14 甜菜杂交, 观察 F<sub>1</sub> 植株叶柄颜色; 利用 SSR 标记分析甜菜 M14 世代间的遗传相关性。结果显示, 甜菜单体附加系 M14 传递率维持在较高水平; 在人工去雄授粉条件下, F<sub>1</sub> 代植株叶柄颜色均为红色, 甜菜 M14 通过接受外来遗传物质及精卵结合的有性生殖方式繁殖种子; M14 株系中不存在与其母本株 SSR 标记基因型精确相同的植株。表明甜菜 M14 通过精卵融合的有性生殖而非无融合生殖形成种子。Southern 杂交结果显示, 从甜菜 M14 反转得到的栽培甜菜染色体中普遍含有白花甜菜 DNA, 暗示甜菜 M14 形成雌配子体及卵子过程中存在减数分裂过程和较高频率的染色体畸变。推测甜菜单体附加系 M14 高频传递现象可能是由于附加的白花甜菜第 9 染色体具有杀配子功能。

**关键词:** 甜菜单体附加系 M14; 无融合生殖; 有性生殖; 有性杂交; 遗传相关; Southern 杂交

## Seed-Setting Mode of Monosomic Addition Line M14 of *Beta corolliflora* in Sugar Beet

MA Lan<sup>1,2,\*\*</sup>, DU Hong-Yan<sup>1,\*\*</sup>, and LI Rong-Tian<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Molecular Biology, College of Heilongjiang Province / Heilongjiang University, Harbin 150080, China; <sup>2</sup> Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163000, China

**Abstract:** A cross combination of M14 with green petiole  $\times$  *B. vulgaris* with red petiole was prepared to observe the dominant trait marker of hybrid plants, and the genetic correlation between the maternal plant and F<sub>1</sub> generation of M14 based on the SSR analysis. The result showed that M14 had higher transmission rate of the alien chromosome. Multiplied seeds came from the union of male and female gametes under artificial pollination, and the petiole color of all the hybrid plants was red. There was no the exactly identical genotype in the progeny compared with the maternal plant. It indicated that the seed-setting mode of M14 is not apomixis, but sexual reproduction. Southern blot showed that the chromosomes of *B. vulgaris* reversed from M14 sharing the DNA sequence of *B. corolliflora*, it is implying that there was popular meiosis and chromosome aberration during the female gamete formation of sugar-beet M14. The study came to the conclusion that higher transmission frequency of the alien chromosome of sugar-beet M14 is probably induced by the chromosome 9 of *Beta corolliflora* with gametocidal function.

**Keywords:** Monosomic addition line M14 in sugar beet; Apomixis; Sexual reproduction; Hybridization; Genetic correlation; Southern blot

无融合生殖是指被子植物不经减数分裂和受精作用, 直接进行胚的发育而形成种子的生殖方式<sup>[1]</sup>。无融合生殖可以固定作物杂种优势, 对其开发和利用可能是继 1960 年代绿色革命后的又一次更有意义的革命<sup>[2]</sup>。普通栽培甜菜(*B. vulgaris*, VV, 2n=18)染色体组附加了白花甜菜(*B. corolliflora*, CCCC, 2n=36)第 9 染色体而形成的单体附加系 M14 甜菜(VV+1C<sub>9</sub>, 2n=19), 因其可能具有无融合生殖特性, 成为克隆无融合生殖基因<sup>[3-6]</sup>和其他基因<sup>[7]</sup>以及从事

分子生物学研究<sup>[8-9]</sup>的作物种质资源。破解无融合生殖这一世界性难题, 首先要求用于研究的作物材料具有准确的无融合生殖特性。因此, 有必要对甜菜单体附加系 M14 的种子形成方式进行充分研究。

甜菜 M14 品系培育的过程为, 利用普通栽培甜菜初级三体(VV+1C, 2n=19)与野生四倍体白花甜菜(CCCC, 2n=36)进行种间杂交, 在杂交后代群体中获得真实杂种 VC88-1 (VVCC, 2n=36); VC88-1 与普通栽培甜菜回交, 合成异源三倍体甜菜 B14 (VVC,

本研究由国家转基因研究与产业化开发专项(JY-03A-24-02)和黑龙江省研究生创新科研项目(YJSCX2009-017HLJ)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 李荣田, E-mail: lirongtian07@yahoo.com.cn, Tel: 0451-86608243

第一作者联系方式: E-mail: malan042999@163.com \*\*同等贡献(Contributed equally to this work)

Received(收稿日期): 2012-06-25; Accepted(接受日期): 2012-11-16; Published online(网络出版日期): 2013-01-04.

URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130104.1735.017.html

2n=27); B14 连续与栽培甜菜回交, 分离产生完整的带有白花甜菜染色体的 9 种类型单体附加系, 其中带有白花甜菜第 9 染色体的单体附加系即为甜菜 M14<sup>[10-13]</sup>。根据甜菜 B14 异源三倍体传递率、染色体构型和组成、形态性状和同工酶谱带研究结果, 认为异源三倍体甜菜 B14 具有无融合生殖特性, 并结合 Jassem 报道<sup>[14]</sup>推测无融合生殖基因来源于白花甜菜核基因组<sup>[15-19]</sup>。甜菜单体附加系 M14 遗传了异源三倍体甜菜 B14 的高频传递特性, 据此认为甜菜 M14 品系是无融合生殖材料<sup>[11-12]</sup>。对甜菜 M14 大孢子和雌配子体进行解剖学研究, 认为 M14 甜菜无融合生殖属于蝶须型二倍体孢子生殖, 同时存在非型二倍体孢子生殖和廖型有性生殖现象<sup>[20-25]</sup>。迄今为止, 甜菜 M14 的无融合生殖证据来自形态学、细胞学、同工酶和胚胎学研究结果, 尚缺少直接的遗传

学证据。本研究拟通过常规有性杂交和分子生物学方法, 明确甜菜 M14 品系种子形成方式, 以期为准确地、有效地利用高频传递甜菜单体附加系 M14 提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

基础甜菜材料(表1)包括绿叶柄 M14 甜菜(甲株、乙株)、绿叶柄栽培甜菜和红叶柄栽培甜菜。

甜菜杂交和自由授粉后代群体见表 2。从 18 对甜菜 SSR 引物中, 筛选到 11 对引物, 能够以甜菜核基因组 DNA 为模版, 扩增出清晰、可重复的条带。利用这 11 个 SSR 标记(表 3), 研究 M14 甜菜母本株和后代株系内的 2n=19 植株的遗传相关性。SSR 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1 甜菜基础材料及其特征  
Table 1 Sugar-beet cultivars and their characteristics

材料 Cultivar	代号 Code	染色体组 Chromosome set	体细胞染色体数 Somatic chromosome number
绿叶柄 M14 甜菜(甲株) M14 with green petiole	A	VV+1C <sub>9</sub>	2n=19
绿叶柄 M14 甜菜(乙株) M14 with green petiole	B	VV+1C <sub>9</sub>	2n=19
绿叶柄栽培甜菜 <i>B. vulgaris</i> with green petiole	C	VV	2n=18
红叶柄栽培甜菜 <i>B. vulgaris</i> with red petiole	D	VV	2n=18

表 2 甜菜杂交后代群体和自由授粉株系  
Table 2 Populations between the initial cultivars and plant lines

群体 Population	来源 Origin	植株编号 Plant code
Ha	A×D 的 F <sub>1</sub> (A×D) F <sub>1</sub>	1, 2, 3,...
Hb	B×D 的 F <sub>1</sub> (B×D) F <sub>1</sub>	1, 2, 3,...
Hc	C×D 的 F <sub>1</sub> (C×D) F <sub>1</sub>	1, 2, 3,...
La	A 自由授粉株系 M14 plant line (A) in open pollination	1, 2, 3,...
Lb	B 自由授粉株系 M14 plant line (B) in open pollination	1, 2, 3,...

Ha: [绿叶柄 M14 甜菜(甲)×红叶柄栽培甜菜]F<sub>1</sub>; Hb: [绿叶柄 M14 甜菜(乙)×红叶柄栽培甜菜]F<sub>1</sub>; Hc: (绿叶柄栽培甜菜×红叶柄栽培甜菜)F<sub>1</sub>; La: A 自由授粉株系; Lb: B 自由授粉株系。

Ha: [M14 with green petiole (A) × *B. vulgaris* with red petiole] F<sub>1</sub>; Hb: [M14 with green petiole (B) × *B. vulgaris* with red petiole] F<sub>1</sub>; Hc: *B. vulgaris* with green petiole × *B. vulgaris* with red petiole; La: M14 plant line (A) in open pollination; Lb: M14 plant line (B) in open pollination.

表 3 甜菜 SSR 标记及其引物序列  
Table 3 Primers for SSR analysis of sugar-beet M14

名称 Name	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
SB06	AAATTTTCGCCACCACTGTC	ACCAAAGATCGAGCGAAGAA
SB07	TGTGGATGCGCTTCTTTTC	ACTCCACCCATCCACATCAT
SB09	TGCATAAAACCCCCAACAAAT	AGGGCAACTTTGTTTTGTGG
SB10	TTCGTCCCTTGATTGTGTCA	GAGATTGGGGATCACTCTGC
SB11	CGAGGGGTAAAAACGAGACAA	GGTTCTGAAATTGGGGGGTT
SB13	ACAGCAAGATCAGAGCCGTT	TGGACCCACCATTATACATCA
SB15	CACCCAGCCTATCTCTCGAC	GTGGTGGGCAGTTTTAGGAA
C	ACTTCTAATGGAGTAAGAATG	ACGGCTACAGGAGAATATTA
Bmb1	AAATGARGCAAATGGACAGGG	ACAAAGGTCTGCGACCATGAG
Bmb4	CCTCTTTATTTCACGAGGTCCC	CCCAGATTGAAATCAGGATCG
Bmb6	CTCTGCCTGAATTACTAATCC	CAACTCAATCAGGCAGTGC

Southern blot 探针 pBC1054 为本实验室保存。探针 pBC1054 是白花甜菜特异和全基因组散在的重复序列<sup>[26]</sup>。高效 DNA 地高辛标记和检测 KitI 购于 Roche 公司。其他分子生物学试剂购自于 Sigma 公司、Promega 公司或 TaKaRa 公司, 化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 田间试验

1.2.1 杂交和自由授粉 分别以绿叶柄 M14 甜菜(甲株、乙株)、绿叶柄栽培甜菜为母本, 人工去雄; 用红叶柄栽培甜菜花粉为其授粉, 套袋杂交, 收获母本株种子, 分别获得群体 Ha、Hb 和 Hc。同时, 令绿叶柄 M14 甜菜(甲株、乙株)其他花序在甜菜田间无控制授粉, 分别收获 La 和 Lb 种子。

1.2.2 体细胞染色体数和叶柄颜色观察 早春将甜菜 Ha、Hb、Hc、La 和 Lb 的种子播于温室花盆中, 幼苗期取心叶检查体细胞染色体数。用 0.002 mol L<sup>-1</sup> 8-羟基喹啉预处理, 盐酸乙醇混合液快速细胞解离, 石炭酸品红染色压片, 显微镜观察染色体数目。传递率%=(单体附加系株数/总株数)×100。同时, 观察记载 Ha、Hb 和 Hc 群体各植株叶柄颜色。

1.3 分子生物学验证

1.3.1 SSR 分析 采用 CTAB 法提取甜菜单体附加系 M14 品系 2 个株系的母本株 A 和 B 以及自由授粉后代 La 和 Lb 株系中染色体数 2n=19 植株基因组 DNA。SSR 反应体系为甜菜 DNA (50 ng μL<sup>-1</sup>)、Mg<sup>2+</sup> (25 mmol L<sup>-1</sup>)、dNTPs (2.5 mmol L<sup>-1</sup>)、引物(5 μmol L<sup>-1</sup>)以及 Taq 酶(2.5 U μL<sup>-1</sup>); 反应条件为 95℃ 预变性 1 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 35 次; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。利用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物。在电泳图谱中, 甜菜 M14 母本株和其株系各 2n=19 植株都具有的条带为公共带, 表示无多态性, 其余为多态性带, 有带记为 1, 无带记为 0, 计算母本株与

株系各单体附加系植株遗传相似系数。  
1.3.2 Southern 杂交 利用 CTAB 法提取 M14 甜菜甲株和乙株的基因组 DNA, 甜菜 Ha 和 Hb 群体中染色体数 2n=18 或 2n=28 植株的基因组 DNA, 以及 Hc 群体植株混合样品的基因组 DNA。用 Hae III 酶切甜菜 DNA, 将酶切产物电泳、点膜及转膜<sup>[27]</sup>。按照地高辛标记及检测 KitI 说明书进行探针制备、预杂交、杂交、洗膜和检测等。

2 结果与分析

2.1 M14 甜菜单体附加系传递率

从表 4 可见, 甜菜单体附加系 M14 与栽培甜菜杂交后代以及无控制授粉后代株系, 各群体 2n=19 植株占多数, 单体附加系传递率均在 50% 以上, 验证了 M14 甜菜具有高频传递特性。Ha 群体中体细胞染色体数 2n=18 的甜菜 6 株, Hb 群体中有 1 株体细胞染色体数 28 的植株、6 株体细胞染色体数 18 的植株, 甜菜 M14 和红叶柄栽培甜菜杂交 F<sub>1</sub> 群体中反转出 2n=18 的栽培甜菜合计 12 株。La 群体共有 28 株甜菜, 其中体细胞染色体数 2n=19 的甜菜 16 株; Lb 群体甜菜 29 株均为单体附加系甜菜。

2.2 M14 甜菜与红叶柄栽培甜菜有性杂交后代

绿叶柄栽培甜菜和红叶柄栽培甜菜杂交 F<sub>1</sub> 群体 Hc 有 5 株, 叶柄颜色均为红色, 体细胞染色体数 2n=18, 证明红叶柄栽培甜菜在叶柄颜色基因位点上为纯合体, 红叶柄是显性基因控制的相对性状。绿叶柄甜菜 M14 品系(甲株)与红叶柄栽培甜菜杂交 F<sub>1</sub> 群体 Ha 有 13 株(表 4), 所有植株叶柄均为红色, 这 13 株是绿叶柄甜菜 M14 提供卵子、红叶柄栽培甜菜提供精子、精卵细胞有性生殖后代。与 Ha 群体类似, 甜菜 M14 品系(乙株)和红叶柄栽培甜菜的杂种 Hb 群体包括 16 株(表 4), F<sub>1</sub> 代各植株叶柄颜色都为红色, 甜菜 M14 品系不存在孤雌生殖现象。

表 4 甜菜 M14 品系与栽培甜菜杂交后代及其株系群体单体附加系传递率  
Table 4 Transfer rate of monosomic addition line in sugarbeet (%) between M14 and *B. vulgaris* and the M14 plant lines

群体 Population	株数 Plant number	具有不同体细胞染色体数的植株数 Plant number with different somatic chromosome (plant)			单体附加系传递率 Transfer rate of monosomic addition line in sugarbeet (%)
		2n=18	2n=19	2n=28	
Ha	13	6	7	0	53.85
Hb	16	6	9	1	56.25
La	28	12	16	0	57.14
Lb	29	0	29	0	100.00

Ha: (绿叶柄 M14 甜菜(甲)×红叶柄栽培甜菜)F<sub>1</sub>; Hb: (绿叶柄 M14 甜菜(乙)×红叶柄栽培甜菜)F<sub>1</sub>; La: A 自由授粉株系; Lb: B 自由授粉株系。  
Ha: [M14 with green petiole (A) × *B. vulgaris* with red petiole] F<sub>1</sub>; Hb: [M14 with green petiole (B) × *B. vulgaris* with red petiole] F<sub>1</sub>; La: M14 plant line (A) in open pollination; Lb: M14 plant line (B) in open pollination. La: M14 plant line (A) in open pollination; Lb: M14 plant line (B) in open pollination.

由表 4 可知, Ha 群体和 Hb 群体体细胞染色体数 19 条的植株占多数, 甜菜 M14 和栽培甜菜杂交后代单体附加系高频传递, 高频传递的甜菜单体附加系是精卵结合有性生殖后代。在人工给 M14 甜菜授粉情况下, 未发现高频传递甜菜单体附加系存在无融合生殖现象。

2.3 M14 甜菜世代间遗传相关性

根据所使用的 SSR 引物, 对 M14 甜菜单体附加系 2 个株系及其母本株 PCR 反应产物变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示, 所有 SSR 引物均扩增出多态性条带。图 1 为引物 SB11 对 Lb 株系内的染色体数  $2n=19$  植株及其母本株 PCR 扩增产物变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。

由表 5 可见, M14 甜菜(甲株)和 M14 甜菜(乙株)产生的株系内单体附加系, 不存在与母本株遗传相似系数达到 1.000 的植株。这说明, M14 甜菜 2 个株

系虽然表现单体附加系高频传递, 但是没有产生与母本株遗传性状精确相同的单体附加系后代。在无控制授粉情况下, 未发现高频传递的甜菜单体附加系 M14 存在无融合生殖现象。

2.4 从 M14 甜菜反转的栽培甜菜染色体中存在白花甜菜 DNA 的渗入

由图 2 可见, 绿叶柄栽培甜菜与红叶柄栽培甜菜杂种 DNA 和探针没有杂交信号, 说明栽培甜菜核基因组中不存在白花甜菜探针 pBC1054 染色体同源片段。甜菜 M14 (甲株)、甜菜 M14 (乙株)、以及 M14 甜菜(甲株)×栽培甜菜产生的体细胞染色体 28 条的杂种, 均可见到与探针清晰的杂交阳性信号, 说明 Southern 杂交体系是有效的, 只要含有白花甜菜核基因组 DNA, 就可被探针 pBC1054 通过分子杂交检测到。甜菜 M14 和红叶柄栽培甜菜杂交  $F_1$  群体中反转的普通栽培甜菜 DNA, 与探针 pBC1054 进行

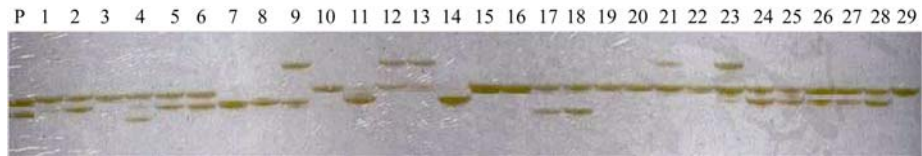


图 1 SSR 标记 SB11 对 M14 甜菜(乙株)及其株系的 PCR 产物变性聚丙烯酰胺凝胶电泳  
Fig. 1 Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis of the SSR of maternal plant and plants of the plant lines  
P: M14 甜菜(乙株); 1~29: Lb 株系内的单体附加系。  
P: sugar beet M14-B; 1~29: monosomic addition lines of the plant line Lb.

表 5 M14 甜菜株系内单体附加系植株与母本株遗传相似性  
Table 5 Genetic similarity coefficient between monosomic addition line plants of M14 and the maternal plants

La 株系 Plant line La		Lb 株系 Plant line Lb			
序号 No.	遗传相似系数 Genetic similarity coefficient	序号 No.	遗传相似系数 Genetic similarity coefficient	序号 No.	遗传相似系数 Genetic similarity coefficient
1	0.912	1	0.780	17	0.695
2	0.930	2	0.763	18	0.763
3	0.632	3	0.847	19	0.780
4	0.544	4	0.712	20	0.814
5	0.649	5	0.831	21	0.593
6	0.596	6	0.780	22	0.797
7	0.737	7	0.780	23	0.610
8	0.526	8	0.746	24	0.695
9	0.667	9	0.780	25	0.687
10	0.807	10	0.746	26	0.712
11	0.789	11	0.831	28	0.729
12	0.561	12	0.695	28	0.780
13	0.719	13	0.797	29	0.763
14	0.614	14	0.695		
15	0.649	15	0.780		
16	0.737	16	0.746		

La: 自由授粉株系 A; Lb: 自由授粉株系 B。La: M14 plant line (A) in open pollination; Lb: M14 plant line (B) in open pollination.

斑点杂交, 反转的 12 株栽培甜菜中有 9 株存在阳性信号(图 2 斑点 2、3、4、5、7、10、11、12 和 13), 3 株未见杂交信号(图 2 斑点 6、8 和 9), 含有白花甜菜 DNA 的反转栽培甜菜比率高达 75%。与斑点杂交结果类似, Southern 印迹杂交结果显示, 从 M14 甜菜反转的 12 株栽培甜菜中有 6 株存在明确的杂交阳性信号(图 3 泳道 4、5、10、11、12 和 13), 有 6 株未见杂交信号(图 3 泳道 2、3、6、7、8 和 9), 含有白花甜菜 DNA 的反转栽培甜菜比例为 50%。结果表明, 甜菜单体附加系 M14 在繁殖种子后代过程中, 附加的白花甜菜第 9 染色体片段渗入到栽培甜菜染色体组中是普遍现象, 暗示 M14 甜菜形成雌配子过程中染色体配对、交叉、交换等是普遍发生的。M14 甜菜无减数分裂过程, 有丝分裂形成不减数的雌配子, 雌配子不接受外来遗传物质直接发育成种子, 即无融合生殖, 可能是极其偶然的发现。

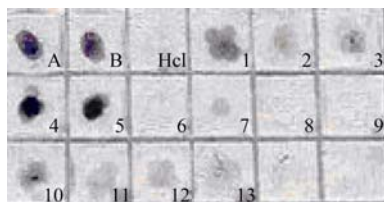


图 2 甜菜 DNA/*Hae* III 和探针 pBC1054 印迹杂交  
Fig. 2 Dot blot of the sugar beet DNA/ *Hae* III with the probe pBC1054

A: M14 甜菜(甲株); B: M14 甜菜(乙株); Hcl: Hc 群体各植株混合样品; 1: Ha 群体中  $2n=28$  的植株; 2~13: Ha 和 Hb 群体中  $2n=18$  的植株。

A: sugar beet M14-A; B: sugar-beet M14-B; Hcl: mixed specimen of each plant of Hc; 1: plant with 28 chromosomes in population Ha; 2~13: plant with 18 chromosomes in populations Ha and Hb.



图 3 甜菜 DNA/*Hae* III 和探针 pBC1054 印迹杂交  
Fig. 3 Southern blot of the sugar beet DNA/ *Hae* III with the probe pBC1054

A: M14 甜菜(甲株); B: M14 甜菜(乙株); Hcl: Hc 群体各植株混合样品; 1: Ha 群体中  $2n=28$  的植株; 2~13: Ha 和 Hb 群体中  $2n=18$  的植株。

A: sugar beet M14-A; B: sugar-beet M14-B; Hcl: mixed specimen of each plant of Hc; 1: plant with 28 chromosomes in population Ha; 2~13: plant with 18 chromosomes in populations Ha and Hb.

### 3 讨论

利用携带显性标记性状的父本与无融合生殖材

料杂交, 是验证无融合生殖的一种直观、有效手段。Maguire 等<sup>[28]</sup>以高频传递的玉米单体附加系为母本, 以携带显性标记性状的玉米为父本进行杂交, 所有  $F_1$  个体都表现父本所携带的显性标记性状, 表明供试的玉米单体附加系行有性生殖。母本形成的种子有受精行为。本研究中, 以绿叶柄甜菜 M14 为母本, 以携带显性标记性状的、基因型纯合的红叶柄栽培甜菜为父本进行杂交, 杂种  $F_1$  代所有植株的叶柄颜色均为红色, 表明甜菜 M14 在形成种子的过程中接受了外来遗传物质。同时, 甜菜 M14 品系单体附加系仍然具有高频传递特性。高频传递单体附加系甜菜 M14 在人工去雄授粉条件下, 未发现不经精卵融合而产生种子的现象, M14 甜菜通过性生殖产生种子。

植物无融合生殖胚的形成由于没有父本的参与, 其后代是母本基因型的精确克隆<sup>[29]</sup>。对植物无融合生殖的鉴定, 最初主要依据植物个体和群体的形态指标, 以及生物化学指标(主要是同工酶分析法), 由此判定亲子间遗传物质一致性比较困难。DNA 分子标记的出现和应用, 使植物无融合生殖的判定取得了长足的发展。Bracaccia 等<sup>[30]</sup>利用 RAPD 技术可以把兼性无融合生殖 *Poa pratensis* 的无融合生殖后代与有性生殖后代区分开来。如果甜菜 M14 行兼性无融合生殖, 后代株系部分植株和母本株 DNA 标记带型应该完全相同。利用 11 个甜菜 SSR 标记, 研究高频传递单体附加系甜菜 M14 母本株和其在自由授粉条件下产生的后代株系中体细胞染色体数目为  $2n=19$  植株的遗传相关性, 结果显示 M14 甜菜不同世代间单体附加系遗传相似系数均小于 1, 未发现和母本株基因型相同的后代植株。在无控制授粉条件下, 无论是单体附加系传递率 57.14% 的甜菜 M14 株系还是传递率 100% 的甜菜 M14 株系, 都没有通过种子繁殖产生出基因型和母本精确相同的无性系, 说明高频传递甜菜单体附加系 M14 不存在无融合生殖现象。

对无融合生殖的鉴定, 从单一方面的研究或以部分研究结果下结论, 可能出现错误。康传红等<sup>[15]</sup>研究发现甜菜 B14 异源三倍体世代间高频传递、植株形态及生长习性相似、染色体组成相同(即 VVC); 李勇等<sup>[16]</sup>研究甜菜 B14 表明, 自由授粉条件下异源三倍体高频传递, 不同株系间或有的株系植株间形态性状和同工酶谱变异较大, 有的株系不同植株间形态性状和部分同工酶谱相同或相似, 据此认为甜菜 B14 有的株系是无融合生殖材料。根据异源三倍

体材料世代间体细胞染色体数、构型及染色体组成上没有差别, 定论甜菜 B14 行无融合生殖似乎不妥当。亲子代体细胞染色体组成相同, 不等于基因型精确相同, 不等于子代是亲代通过细胞有丝分裂无性生殖的后代。甜菜 B14 体细胞染色体组成是 VVC, 如果无融合生殖特性由白花甜菜染色体组 C 导致, 那么就不能解释有的株系是无融合生殖材料而有的株系是有性生殖材料的现象。即使所谓的 B14 甜菜无融合生殖株系, 不同植株间也只是部分而非全部同工酶谱带相同<sup>[16]</sup>。因此, (通过选择的)异源三倍体甜菜 B14 是无融合生殖材料<sup>[17-19]</sup>的结论似乎不够准确。

利用栽培甜菜和异源三倍体甜菜 B14 连续杂交, 获得的甜菜单体附加系 M14 具有高频传递特性<sup>[13,21]</sup>。依据 M14 甜菜亲本 B14 甜菜异源三倍体高频传递是来自白花甜菜染色体无融合生殖基因的结论, 推定 M14 甜菜是无融合生殖材料<sup>[11-12]</sup>。甜菜 B14 具有无融合生殖特性的证据不够充分, 由甜菜 B14 推定 M14 甜菜是无融合生殖材料就更难以令人信服。康传红等<sup>[31]</sup>利用 9 个 RAPD 标记鉴定 M14 甜菜世代间遗传性状一致性, 发现有 6 个引物在 M14 甜菜不同世代间植株 PCR 扩增产物电泳带型一致, 3 个引物不一致, 推定 M14 甜菜是无融合生殖材料。而根据多数 DNA 分子标记基因型相同而得出甜菜 M14 行无融合生殖的结论是错误的。既然是无融合生殖, 亲代和子代的基因型应该精确相同。其实, 根据康传红等<sup>[31]</sup>试验数据恰恰说明 M14 甜菜可能行有性生殖。

一些研究者从胚胎学角度研究甜菜 M14, 申业等<sup>[20-22]</sup>在光镜水平观察 M14 甜菜大孢子、胚囊, 认为 M14 甜菜无融合生殖类型是蝶须型二倍体孢子生殖, 这一研究结论似乎是在已经确定 M14 甜菜行无融合生殖前提下, 为其无融合生殖寻找的胚胎学方面解释。申业等<sup>[20]</sup>观察到甜菜 M14 胚珠存在普遍退化现象、大多数被观察胚珠及其胚囊珠孔处未见花粉管及受精作用、助细胞提前退化等, 这些现象可能由非整倍体甜菜胚囊退化所致。根据 M14 甜菜大孢子发生期间细胞壁胼胝质变化及胚囊情况, M14 甜菜胚囊 40%蝶须型、50%韭型和 6%蓼型, 韭型和蓼型胚囊发育过程中细胞壁等处有胼胝质并有减数分裂或部分减数分裂现象, 蝶须型胚囊发育过程中细胞壁无胼胝质<sup>[21]</sup>, 韭型和蝶须型的大孢子母细胞不进行减数分裂, 直接分化为二倍体功能大孢子, 再经有丝分裂形成二倍体的雌配子体<sup>[21]</sup>。申业等<sup>[20-21]</sup>观察到 M14 甜菜韭型胚囊完成减数分裂 I, 可能受到

观察胚珠数量限制导致客观存在的减数分裂 II 未被研究者未观察到; 申业等<sup>[20-21]</sup>观察到 M14 甜菜二倍体的蝶须型胚囊, 也可能是单体附加系甜菜大孢子母细胞不均等减数分裂形成的  $n=19=VV+1C_9$  大孢子形成的雌配子体。在电镜水平, 观察 M14 甜菜大孢子发生<sup>[22]</sup>、成熟胚囊<sup>[23]</sup>、雌配子体发育<sup>[24]</sup>的超微结构, 大孢子发生发育及成熟胚囊结构特征与光镜下研究结果相似。胚胎学研究发现的 M14 甜菜存在二倍体的雌配子体, 不能成为 M14 甜菜行无融合生殖的直接证据。

有性生殖的植物单体附加系传递率一般不可能大于 50%。但是, 本研究无论是自由授粉、还是人工杂交, 甜菜 M14 的传递率虽然低于以往报道的 95%<sup>[20]</sup>, 但是仍高于 50%, 甜菜 M14 具有高频传递特性。绿叶柄 M14 甜菜×红叶柄栽培甜菜的  $F_1$  世代单体附加系高频传递, 这说明甜菜 M14 的  $n+1$  卵子 ( $V+1C_9$ ) 和  $n$  卵子 ( $V$ ) 相比较具有优先传递特性。杀配子染色体也有可能引起这种现象<sup>[31]</sup>。Maguire<sup>[28]</sup>创造的玉米单体附加系高频传递的原因, 是由于附加的摩擦禾染色体为杀配子染色体或携带杀配子基因。杀配子染色体可诱导不含它的雌配子中的染色体发生断裂, 从而在子代体细胞中出现染色体畸变, 如缺失、易位、环状染色体和双着丝点染色体等现象<sup>[32]</sup>。本研究 Southern 杂交结果显示, 虽然探针 pBC1054 和普通栽培甜菜基因组无同源性, 但却和甜菜 M14×红叶柄栽培甜菜子代中反转的栽培甜菜 50%植株的 DNA 产生杂交信号。这说明甜菜 M14 在形成减数卵子过程中染色体发生了畸变, 且频率较高。这暗示白花甜菜第 9 染色体有可能是杀配子染色体, M14 甜菜单体附加系高频传递有可能是杀配子染色体作用的结果。

## 4 结论

具有高频传递特性的甜菜单体附加系 M14 通过精卵结合形成种子, 未发现甜菜 M14 品系行无融合生殖。通过讨论推测, 甜菜 M14 单体附加系高频传递可能是由于白花甜菜第 9 染色体具有杀配子功能。

## References

- [1] Bicknell R A, Koltunow A M. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *Plant Cell*, 2004, 16: 228–245
- [2] Vielle-Calzada J P, Charles F G, David M S. Apomixis: the asexual revolution. *Science*, 1996, 274: 1322–1323



- [3] Fang X H, Gu S H, Xu Z Y, Chen F, Guo D D. Construction of a binary BAC library for an apomictic monosomic addition line of *Beta corolliflora* in sugar beet and identification of the clones derived from the alien chromosome. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1420–1425
- [4] Yu B(于冰), Li H-Y(李海英), Ma C-Q(马春泉), Zhang S-J(张绍军), Li R-T(李荣田), Guo D-D(郭德栋). Construction of the subtractive cDNA library of buds of the apomictic monosomic addition line in sugar beet. *High Technol Lett* (高技术通讯), 2006, 16(9): 954–958 (in Chinese with English abstract)
- [5] Ma C-Q(马春泉), Zhang Y(张莹), Cui Y(崔颖), Li H-Y(李海英). Construction of cDNA library in florescence and screening specifically expressed genes in sugar beet M14. *Bull Bot Res* (植物研究), 2008, 28(4): 408–411(in Chinese with English abstract)
- [6] Ge Y, He G C, Guo D D, Li R T. GISH and BAC-FISH study of apomictic *Beta* M14. *Sci in China: Series C Life Sci*, 2007, 50: 242–250
- [7] Ma C, Wang Y, Wang L, Chen S, Li H. Identification of a sugar beet BvM14-MADS box gene through differential gene expression analysis of monosomic addition line M14. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 1980–1986
- [8] Li H Y, Cao Y G, Wang Y G, Ma C Q, Chen S X. Proteomic analysis of sugar beet apomictic monosomic addition line M14. *J Proteomics*, 2009, 73: 297–308
- [9] Zhu H, Bi Y D, Yu L J, Guo D D, Wang B C. Comparative proteomic analysis of apomictic monosomic addition line of *Beta corolliflora* and *Beta vulgaris* L. in sugar beet. *Mol Biol Rep*, 2009, 36: 2093–2098
- [10] Guo D-D(郭德栋), Li S-X(李盛贤), Jia S-B(贾树彪), Kang C-H(康传红), Li Y(李勇). Studies on the interspecific hybridization in genus *Beta*. *Sugar Crops China* (中国糖料), 1999, (2): 1–8 (in Chinese with English abstract)
- [11] Guo D-D(郭德栋), Fang X-H(方晓华), Liu L-P(刘丽萍), Kang C-H(康传红), Li Y(李勇), Wang G-Z(王桂芝). Acquisition and identification of monosomic additional lines of apomictic beet. *J Yunnan Univ* (云南大学学报), 2000, 34(5): 1–3 (in Chinese with English abstract)
- [12] Guo D-D(郭德栋), Liu L-P(刘丽萍), Kang C-H(康传红). The transmission and reproductive characters of apomictic monosomic addition lines of *Beta vulgaris* L. *J Nat Sci Heilongjiang Univ* (黑龙江大学自然科学学报), 2001, 18(3): 104–107 (in Chinese with English abstract)
- [13] Gao D-J(高东杰), Kang C-H(康传红), Liu L-P(刘丽萍), Guo D-D(郭德栋), Fang X-H(方晓华). A full set of monosomic addition lines in *Beta vulgaris* from *B. corolliflora*. *Sugar Crops China* (中国糖料), 2001, (4): 5–9 (in Chinese with English abstract)
- [14] Jassem B. Apomixis in the Genus *Beta*. *Apomixis Newslett*, 1990, (2): 7–23
- [15] Kang C-H(康传红), Wang G-Z(王桂芝), Jia S-B(贾树彪), Guo D-D(郭德栋), Liu L-P(刘丽萍). Observation on apomixes of progenies of interspecific hybridization between *Beta vulgaris* L. and *Beta corolliflora*. *China Sugarbeet* (中国甜菜), 1995, (1): 3–8 (in Chinese with English abstract)
- [16] Li Y(李勇), Liu W(刘威), Kang C-H(康传红), Jia S-B(贾树彪), Guo D-D(郭德栋). Morphological and isozyme variations of apomictic lines from hybrid progenies between *B. vulgaris* L. and *B. corolliflora*. *Sugar Crops China* (中国糖料), 1997, (2): 6–9 (in Chinese with English abstract)
- [17] Guo D-D(郭德栋), Kang C-H(康传红), Liu L-P(刘丽萍), Li Y(李勇), Fang X-H(方晓华). Study of apomixis in the allotriploid beet (VVC). *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1999, 32(4): 1–5 (in Chinese with English abstract)
- [18] Kang C-H(康传红), Liu L-P(刘丽萍), Shen Y(申业), Guo D-D(郭德栋), Fang X-H(方晓华). Studies on apomict transmission rate in allotriploid beet (VVC). *Sugar Crops China* (中国糖料), 1999, (3): 1–5 (in Chinese with English abstract)
- [19] Guo D-D(郭德栋), Li S-X(李盛贤), Jia S-B(贾树彪), Kang C-H(康传红), Li Y(李勇). Studies on the Interspecific Hybridization in Genus *Beta*. *Sugar Crops China* (中国糖料), 1999, (2): 1–6 (in Chinese with English abstract)
- [20] Shen Y(申业), Shen J-H(申家恒), Guo D-D(郭德栋), Fang X-H(方晓华), Liu L-P(刘丽萍). Dynamics of callose deposition in cell wall during megasporogenesis in the apomictic monosomic addition line M14 of *Beta corolliflora* of sugar beet. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2006, 32(6): 894–898 (in Chinese with English abstract)
- [21] Shen Y(申业), Shen J-H(申家恒), Guo D-D(郭德栋), Fang X-H(方晓华), Liu L-P(刘丽萍). Cyto-embryological study of the apomictic monosomic addition line M14 in sugar beet. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), 2006, 26(5): 957–963 (in Chinese with English abstract)
- [22] Shen Y(申业), Shen J-H(申家恒), Guo D-D(郭德栋), Fang X-H(方晓华), Liu L-P(刘丽萍). Megasporogenesis and development of female gametophyte in the apomictic monosomic addition line M14 of *Beta corolliflora* in sugar beet. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 2006, 24(2): 106–113 (in Chinese with English abstract)
- [23] Ding C-H(丁常宏), Shen J-H(申家恒), Guo D-D(郭德栋), Shang Y-J(尚娅佳). Ultrastructure of megasporogenesis in facultative apomictic monosomic addition line M14 of *Beta corolliflora* of sugar beet. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(8): 1516–1524 (in Chinese with English abstract)
- [24] Shang Y-J(尚娅佳), Shen J-H(申家恒), Guo D-D(郭德栋), Ding C-H(丁常宏). Ultrastructural characterization of the mature embryo sac in the chromosome-9 monosomic addition line of *Beta corolliflora* in sugar beet. *Chin Bull Bot* (植物学报), 2009, 44(6):

- 682–693 (in Chinese with English abstract)
- [25] Shang Y-J(尚娅佳), Shen J-H(申家恒), Guo D-D(郭德栋), Ding C-H(丁常宏). The ultrastructural changes of female gametophyte during Its development in the apomictic monosomic addition line M14 of *Beta corolliflora* in sugar beet. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2010, 43(1): 29–38 (in Chinese with English abstract)
- [26] Gao D J, Schmidt T, Jung C. Molecular characterization and chromosomal distribution of species-specific repetitive DNA sequences from *Beta corolliflora*, a wild relative of sugar beet. *Genome*, 2000, 43: 1073–1080
- [27] Li R T, Zhang Z M, Zhang Q F. Transformation of japonica rice with RHL gene and salt tolerance of the transgenic rice plant. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2002, 47(8): 613–617
- [28] Maguire M P. High transmission frequency of a tripsacum chromosome in corn. *Genetics*, 1963, 48: 1185–1194
- [29] Nogler G A. Genetics of apomictic in *Ranuncuclu auricomus*: VI. Epilogue. *Bot Helvet*, 1995, 105, 111–115
- [30] Bracaccia G, Mazzucato A, Belardinelli A. Inheritance of parental genomes in progenies of *Poa pratensis* L. from sexual and apomictic genotypes as assessed by RAPD markers and flow cytometry. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 516–524
- [31] Kang C-H(康传红), Han X-Y(韩晓云), Wang Z-W(王志伟), Guo D-D(郭德栋), Wang G-Z(王桂芝). RAPD analysis to confirm the identification of three progenies of M14 beta vulgaris additional lines. *Biotechnology* (生物技术), 2002, (4): 9–11 (in Chinese with English abstract)
- [32] Endo T R. Gametocidal chromosomes and their induction of chromosome mutations in wheat. *Jpn J Genet*, 1990, 65: 135–152